



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA DE UNA FORMULACIÓN
LIPOSOMAL DE CISPLATINO Y NANOPARTÍCULAS DE
MAGNETITA”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARIO FLORES CRUZ

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Inés Fuentes Noriega
VOCAL: Alejandro Ortiz Osornio
SECRETARIO: Patricia García López
1er. SUPLENTE: Kenneth Rubio Carrasco
2° SUPLENTE: Patricia Díaz Arista

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ASESOR DEL TEMA:

Patricia García López _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Alfonso Toro Córdova _____

SUSTENTANTE:

Mario Flores Cruz _____

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Hipótesis	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. General	3
1.3.2. Específicos	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Generalidades sobre el cáncer	4
2.2. Tratamientos para el cáncer	5
2.2.1. Cirugía	6
2.2.2. Radioterapia	6
2.2.3. Quimioterapia	7
2.3. Cis-diaminodicloroplatino II	9
2.4. Liposomas	12
2.5. Materiales magnéticos	16
2.6. Farmacocinética	17
2.6.1. Generalidades sobre la farmacocinética	17
2.6.2. Modelo ADME	18
2.6.2.1. Absorción	18
2.6.2.2. Distribución	19
2.6.2.3. Eliminación	19
2.6.3. Parámetros farmacocinéticos	19
2.6.3.1. Volumen de distribución	19
2.6.3.2. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$)	20
2.6.3.3. Depuración (D)	20
2.6.3.4. Área bajo la curva (ABC)	20
2.7. Antecedentes de formulaciones desarrolladas en el INCan	21
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	23

3.1. Reactivos.....	23
3.2. Animales	23
3.3. Formulación Liposomal.....	24
3.4. Farmacocinética de cisplatino liposomal.....	24
3.4.1. Determinación de cisplatino en muestras plasmáticas	25
3.4.1.1. Preparación de curva patrón.....	26
3.4.1.2. Preparación de las muestras.....	26
3.4.1.3. Condiciones cromatográficas.....	26
3.4.2. Análisis farmacocinético	27
3.5. Cuantificación de cisplatino en órganos.....	27
3.6. Cuantificación de hierro en plasma	27
3.7. Análisis estadístico.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Farmacocinética del cisplatino encapsulado en ambas formulaciones liposomales	29
4.2. Farmacocinética de magnetita	30
4.3. Cuantificación de cisplatino en tejidos.....	33
4.4. Toxicidad sistémica.....	33
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	34
6. CONCLUSIONES	43
7. PERSPECTIVAS	43
8. BIBLIOGRAFÍA.....	44

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Debido a que el cáncer es un problema a nivel mundial, porque es la principal causa de muerte siendo responsable de alrededor de 8 millones al año y que además el número de casos de personas que lo presentan va en aumento, ha llevado a la búsqueda de nuevos tratamientos que sean efectivos contra esta situación patológica.

Hasta el momento se cuentan con varias terapias para esta patología que van desde la cirugía hasta la combinación de radiación ionizante y fármacos con acción quimioterapéutica; sin embargo, a pesar de mostrar resultados favorables en etapas tempranas de la enfermedad, hasta el momento no se cuenta con una terapia que sea completamente efectiva, por lo que aún se continúan investigando nuevas alternativas de tratamientos.

Una de las desventajas principales de los agentes quimioterapéuticos, es mostrar una escasa selectividad en tejido tumoral y una acumulación también en tejido sano, presentándose reacciones adversas importantes que pueden llegar a afectar de forma significativa la calidad de vida de los pacientes.

Actualmente una de las áreas de investigación que se han desarrollado es buscar nuevas formas de liberación de estos agentes antineoplásicos que ayuden a mejorar los parámetros farmacocinéticos del fármaco, que sean más selectivos,

que se combinen con otras terapias y que además reduzcan las reacciones adversas que estos le producen a los pacientes. Una de estas formulaciones son los sistemas liposomales, estos consisten en vesículas lipídicas que pueden encapsular fármacos. Algunas de estas formulaciones han sido aprobadas para su uso clínico por la FDA como es el caso del LipoplatinTM y Caelyx®; las cuales han demostrado una disminución de los efectos adversos; sin embargo, no se ha logrado un efecto significativamente mayor a los mostrados por los fármacos convencionales (no encapsulados).

En el presente trabajo se estudió la farmacocinética de una formulación liposomal desarrollada en el Instituto Nacional de Cancerología, que consiste en la co-encapsulación de cisplatino y nanopartículas de magnetita.

1.2 Hipótesis

La formulación liposomal que co-encapsula nanopartículas de magnetita y cisplatino, no mostrará cambios significativos en los parámetros farmacocinéticos (Volumen de distribución, área bajo la curva, depuración, tiempo de vida media y concentración inicial) del cisplatino en comparación al cisplatino liposomal.

Además la magnetita mostrará una farmacocinética parecida al cisplatino liposomal, lo que significa que al estar encapsulada mostrará también una farmacocinética de 2 compartimentos.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Evaluar la farmacocinética preclínica de una formulación liposomal que co-encapsula cisplatino-nanopartículas de magnetita

1.3.2 Específicos

- Determinar los parámetros farmacocinéticos (Volumen de distribución, área bajo la curva, depuración, tiempo de vida media y concentración inicial) de cisplatino de la formulación liposomal.
- Obtener los parámetros farmacocinéticos de hierro de la formulación liposomal.
- Determinar la concentración de cisplatino en tejido hepático, renal y esplénico después de la administración de la formulación.
- Evaluar toxicidad sistémica de la formulación liposomal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades sobre el cáncer.

El cáncer no es sólo una enfermedad, sino que abarca a más de 100, definiéndose como aquella situación patológica cuya principal característica es la proliferación celular incontrolada y por ello las células anormales pueden invadir otros tejidos, su diseminación se logra con ayuda de la circulación sanguínea y linfática.^{1,2}

El cáncer es una de las principales causas de muertes en todo el mundo, siendo responsable de 8.2 millones de muertes en el 2012. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumenten de 14 millones en el 2012 a 22 millones dentro de las próximas 2 décadas.³ Es por ello que es una de las enfermedades más estudiadas y se busca encontrar tratamientos que aumenten la sobrevivencia de los pacientes.

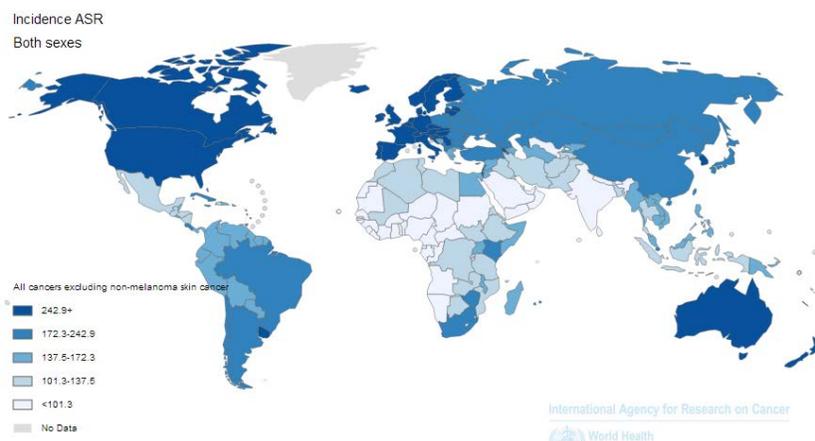


Fig 1. Imagen que ilustra de en el mundo la incidencia de cáncer en cada país por medio del indicador ASR (globocan 2012).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS], 2013).

Durante el 2011, del total de egresos hospitalarios por tumores, 55.6% son por tumores malignos. En la población de menos de 20 años la proporción de egresos hospitalarios por neoplasias malignas en relación con los tumores en general es más alta que en la población adulta (70.6 y 53.2%, respectivamente).

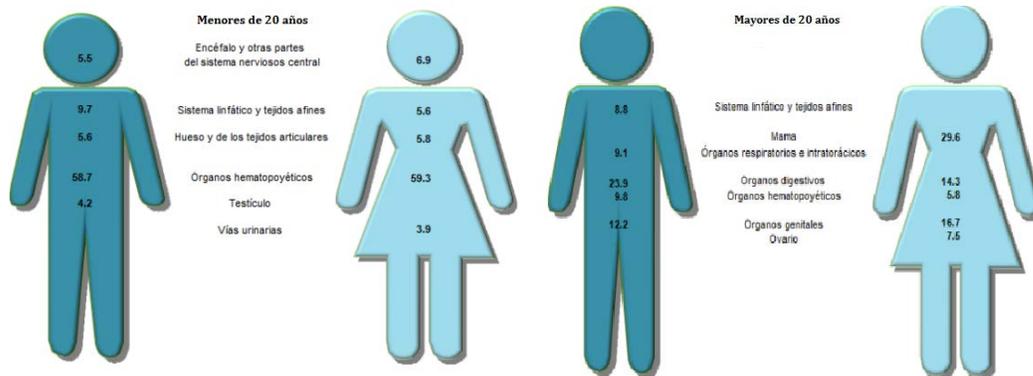


Fig 2. Porcentaje de morbilidad hospitalaria en la población mexicana por principales tumores malignos según sexo, se observa que el porcentaje varía de acuerdo a la edad. (INEGI 2014).

2.2 Tratamientos para el cáncer

La elección del tratamiento contra el cáncer es determinado por el tipo de lesión, grado y estadio del tumor. La Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) en colaboración con la American Joint Committee on Cancer (AJCC), han desarrollado la escala TMN en donde (T) significa tumor primario, (N) ganglios linfáticos superiores y (M) metástasis distante. Consiste en un sistema de estadio de

neoplasias y a estas letras se les asignan índices numéricos que expresan la extensión progresiva de la enfermedad.^{4, 5}

El objetivo de esta escala es determinar el correcto estadio de los diferentes tumores enfocado hacia el manejo clínico, decisión terapéutica (primaria o adyuvante) y evaluación después del tratamiento o pronóstico, primordialmente.⁵

En la actualidad encontramos diferentes tipos de terapia para el tratamiento del cáncer (Terapia hormonal, Inmunoterapia o terapia biológica, trasplante de células hematopoyéticas, etc.)⁶, los tipos más comunes de tratamiento contra el cáncer siguen siendo la cirugía, quimioterapia y radioterapia.^{3, 6, 7}

2.2.1 Cirugía

Consiste en la extirpación del tumor del cuerpo, se ha empleado durante muchos años y es fundamental para el diagnóstico y determinación de si la enfermedad se ha propagado. Cuando el cáncer no se ha propagado a otras partes del cuerpo ofrece la mayor probabilidad de cura, por lo general antes o después de su aplicación se combina con radioterapia y quimioterapia.

2.2.2 Radioterapia

La radioterapia consiste en el uso de partículas u ondas de alta energía, tales como los rayos X, rayos gamma, rayos de electrones y protones, en general

radiaciones ionizantes para eliminar o dañar las células cancerosas.⁸ Tanto la cirugía como la radioterapia se conocen como estrategias de *tratamiento local*, pero debido al desarrollo de micrometástasis iniciales, se vuelve necesario la incorporación de un tratamiento sistémico como lo es la quimioterapia.⁹

2.2.3 Quimioterapia

La quimioterapia se define como el tratamiento de enfermedades por medio de productos químicos.¹⁰ Por lo general el término se asocia con el uso de fármacos para destruir bacterias, virus, hongos y células cancerosas. La quimioterapia se considera como un *tratamiento sistémico* debido a que estos agentes se distribuyen por todo el cuerpo hasta llegar al sitio tumoral.^{11, 12}

Tabla 1. Fármacos antineoplásicos más comunes en el uso clínico. (WHO, 2008).

Agentes alquilantes	Antibióticos citotóxicos	Antimetabolitos y terapia relacionada	Alcaloides de la vinca y etopósido	Otros
Ciclofosfamida	Bleomicina	Citarabina	Vinblastina	Asparaginasa
Clorambucilo	Doxorrubicina	Fluorouracilo	Vincristina	Análogos del platino
	Dactinomicina	Mercaptopurina	Etopósido	Dacarbazina
	Daunorrubicina	Metotrexato		Procarbazina
		Folina de calcio		

Con los métodos actuales de tratamiento, alrededor de un tercio de los pacientes responden utilizando las estrategias de *tratamiento local*; un diagnóstico precoz podría elevar las tasas de curación; sin embargo, las micrometástasis iniciales son una característica de estas neoplasias, por lo que se necesita también de un tratamiento sistémico como la quimioterapia para el tratamiento del cáncer.⁹

Los fármacos con actividad antineoplásica (quimioterapéuticos), inhiben la reproducción celular y con ello permiten la destrucción de la masa tumoral. Por lo general sus mecanismos de acción consisten en provocar una alteración ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, en la división celular, o en la síntesis de proteínas. Sin embargo, uno de los principales problemas de esta terapia es su especificidad, es decir, que por lo general los agentes quimioterapéuticos antineoplásicos no sólo actúan en células cancerosas sino que también actúan en tejido sano con células que tienen una alta tasa de proliferación (médula ósea, epitelio gastrointestinal, etc.)¹³

Actualmente al combinar estos tres tipos de tratamiento (cirugía, radioterapia y quimioterapia) se ha logrado curar a un 50 % de los pacientes a los que se les diagnostica la enfermedad en estudios tempranos. Por el contrario, la quimioterapia por sí sola puede curar casi del 10-15% de los pacientes con cáncer.

En la actualidad se emplea la quimioterapia en tres contextos clínicos principales:

- a) Tratamiento primario de inducción para los casos de enfermedad avanzada o para las neoplasias malignas en las cuáles no hay otros métodos de tratamiento eficaces.

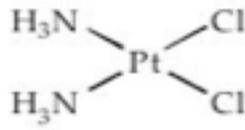
- b) Tratamiento neoadyuvante, donde la quimioterapia se administra antes del tratamiento principal del cáncer como la cirugía o la radioterapia, debido a que las formas de tratamiento local son inadecuadas por sí solas.
- c) Tratamiento adyuvante o coadyuvante en el cual, después de que el cáncer se extirpe por cirugía, se administran quimioterapéuticos con el objetivo de eliminar a aquellas células malignas que puedan quedar residuales.^{9, 11}

2.3 Cis-diclorodiamino platino II

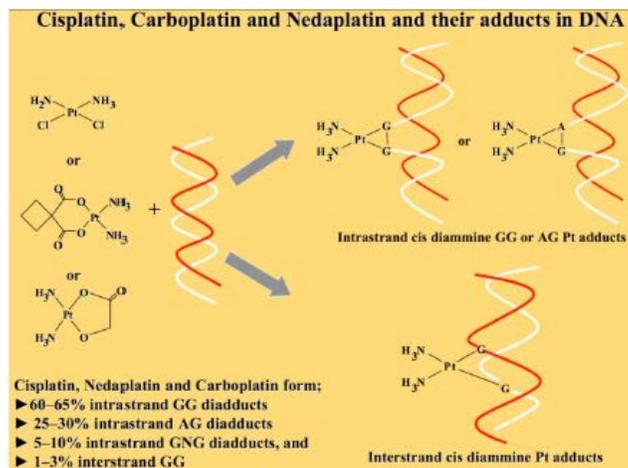
De entre los quimioterapéuticos, actualmente contamos con los análogos del platino, los más utilizados son: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.⁹

El Cisplatino (cis-diclorodiamino platino II) es actualmente, una de las moléculas más importantes en la quimioterapia para el tratamiento del cáncer, además de que puede combinarse con radioterapia y otros quimioterapéuticos (Gentamicina, taxones, etc.).

Fue descubierto por serendipia en 1965, llevando a su identificación en 1969 y su aplicación clínica en los setenta. Usado comúnmente como primera línea para el tratamiento de cánceres como el de pulmón, cabeza y cuello, esófago, colon; mientras que es usado como tratamiento de segunda línea para el cáncer avanzado como el de riñón, hígado, páncreas, próstata, glioblastomas, melanomas metastáticos, mesoteliomas, etc.¹⁴

Fig 3. Estructura del cisplatino. ¹⁶

Aunque no se ha esclarecido de forma precisa el mecanismo de acción de los análogos del platino, se considera que ejercen sus efectos citotóxicos de la misma forma que los fármacos alquilantes. Por ende, destruyen células tumorales en todas las etapas del ciclo celular y se unen al ADN mediante la formación de enlaces cruzados intracatenarios e intercatenarios, lo que origina la inhibición de la síntesis y función del ADN. El principal sitio de unión es en la posición N7 de la guanina, pero también ocurren en la posición N3 de la adenina y la posición O6 de la citosina. Se ha demostrado que también se dirigen a las proteínas citoplasmáticas y nucleares. ⁹

Fig 4. Esquema que ejemplifica la formación de aductos con los análogos del platino. ¹⁶

Sin embargo, uno de los principales problemas que tiene el cisplatino son sus efectos adversos como la toxicidad hacia tejidos sanos, tal es el caso de los riñones, tracto gastrointestinal, médula ósea; astenia, mielopatía, neuropatía periférica y ototoxicidad. Esto podría deberse a que induce la apoptosis en las células normales de esos tejidos.

La eficacia del cisplatino es dosis-dependiente y por tal motivo al aumentar la dosis administrada también se incrementa la nefrotoxicidad como uno de sus principales problemas.¹⁴

Otra de las dificultades que tienen los quimioterapéuticos son los mecanismos de resistencia a fármacos que desarrollan los tumores, como consecuencia trae muchas dificultades porque la inestabilidad de su ADN conlleva a un gran número de mutaciones y fenotipos. Recientemente se ha encontrado que los tumores presentan células madre que son resistentes a los mecanismos de apoptosis, por lo que reduce el efecto de los quimioterapéuticos y vuelven a poblar de células neoplásicas.¹⁵

De acuerdo a estos antecedentes se han buscado nuevas formas para la liberación del fármaco, como son los liposomas. La administración de fármacos a través de formas farmacéuticas con nanopartículas ha traído varias ventajas, por ejemplo la llegada del fármaco al tumor por la extravasación pasiva debido al endotelio alterado e hipervascularización del tumor, por otro lado la acción selectiva del fármaco al reconocer receptores específicos de los tumores. Esto

consiguió que se aumentara la eficacia de moléculas descubiertas con anterioridad y que se redujeran los efectos adversos de estos tratamientos. Uno de los ejemplos de este sistema fue el encapsular al cisplatino en una formulación conocida como Lipoplatin™. ¹⁶

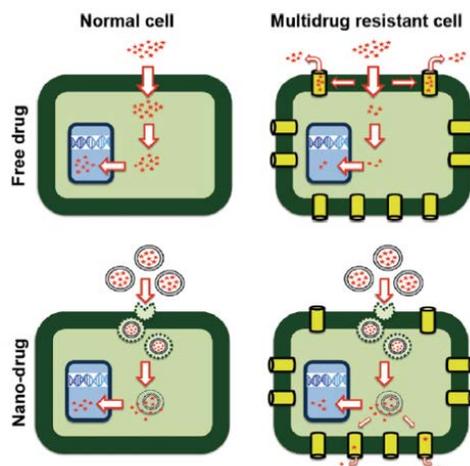


Fig. 5 Esquema donde se ve representado los mecanismos de resistencia hacia los fármacos y el cómo se combaten con los nanomateriales. ¹⁷

2.4 Liposomas

Los liposomas son pequeñas vesículas compuestas de capas lipídicas, los cuales pueden ser usados para encapsular tanto fármacos hidrofóbicos como hidrofílicos, en la bicapa lipídica pueden ser encapsulados los fármacos no polares y en su núcleo acuoso se pueden almacenar los fármacos con naturaleza polar. ^{15, 18, 19}

Los liposomas están constituidos por fosfolípidos y esteroides como el colesterol u otros agentes surfactantes, los cuales forman esferas de bicapas concéntricas de manera espontánea cuando se dispersan en un medio acuoso, debido a las propiedades termodinámicas que confieren los lípidos anfipáticos. ²⁰

El tamaño de los liposomas por lo general se encuentra entre los 80-300 nm y pueden presentar una o más membranas, por ello estos pueden ser clasificados en base a su tamaño y el número de capas de la siguiente manera ²¹:

- a) Vesículas multilaminares (MLV): son aquellos que tienen varias capas concéntricas y por lo general presentan un gran tamaño que está en el rango de los 500-5000 nm.
- b) Vesículas unilaminares: consisten en esferas formadas por una sola bicapa lipídica, pueden ser grandes (LUV) con un tamaño de 200-800 nm o pequeñas (SUV), con un tamaño que no rebasa los 200 nm.

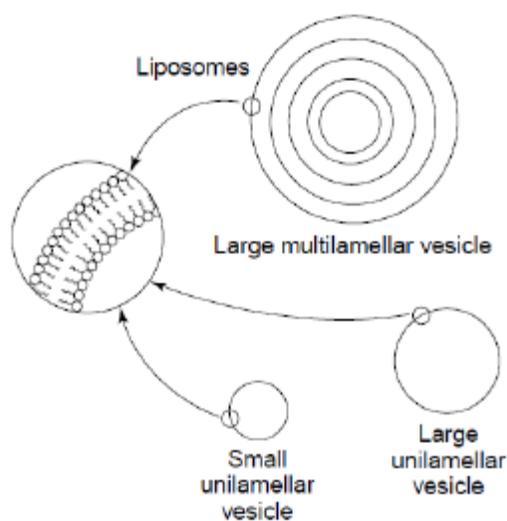


Fig. 6. Clasificación de los liposomas de acuerdo a su tamaño y número de bicapas lipídicas ²².

Se ha demostrado que la farmacocinética del fármaco encapsulado es totalmente distinta a la del fármaco convencional, mostrando principalmente que están más tiempo en circulación, combinado con las propiedades fisiológicas del tumor como una alta vascularización con fenestraciones y la poca o nula circulación linfática,

logra que el fármaco se acumule más en tumor que en tejido sano y con esto se logre una reducción de los efectos tóxicos, un claro ejemplo es el de la Doxorubicina que se ven reducidos sus efectos cardiovasculares al ser encapsulado en la formulación denominada Caelix®.²³

La razón por la que la mayoría de los agentes antineoplásicos presentan toxicidad hacia tejidos sanos, es porque muestran un volumen de distribución alto, lo que significa que se distribuyen en varios tejidos y por lo tanto al administrarse una dosis más alta se incrementará tanto su eficacia como su toxicidad. Las formulaciones liposomales como el lipoplatino ayudan a que el fármaco al estar encapsulado no se una a proteínas plasmáticas y permanezca más tiempo en circulación, con lo que se reduce su volumen de distribución y aumenta su concentración sanguínea.²⁴

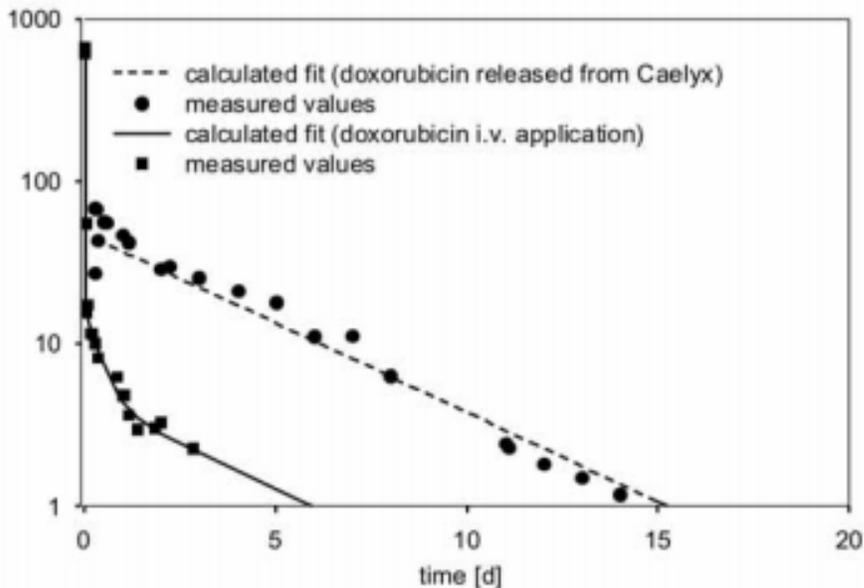


Fig. 7. Concentraciones plasmáticas en función del tiempo de la doxorubicina, se aprecia un aumento significativo de Doxorubicina en la formulación liposomal (Caelix) en comparación con el fármaco convencional.²⁶

Los sistemas liposomales han sido modificados para aumentar su eficacia, por ejemplo, conjugar anticuerpos y ligandos, usar partículas cargadas positivamente, nano o micro partículas magnéticas, etc. Recientemente se ha buscado la aplicación de micro partículas magnéticas a la nanotecnología, esto debido a sus propiedades superparamagnéticas, se tienen reporte del uso de estas con la aplicación de un campo magnético para el tratamiento de nódulos linfáticos.²⁵

Lo anteriormente mencionado nos conduce a otro criterio de clasificación basado en las modificaciones realizadas en la superficie del liposoma²⁷:

- a) Liposomas convencionales: sin ninguna modificación significativa.
- b) Liposomas de circulación prolongada: conocidos como stealth, incorporan en la superficie polímeros biocompatibles hidrofílicos como gangliósidos o el polietilenglicol (PEG), estos provocan una eliminación más lenta y por lo tanto un mayor tiempo de circulación.
- c) Inmunoliposomas: Se conjugan anticuerpos a la membrana para concederles especificidad y acumulación en el sitio reconocido por el anticuerpo.
- d) Liposomas catiónicos: formulación que contiene lípidos cargados positivamente, se utilizan en terapia génica debido a sus interacciones favorables con el ADN y el ARN.

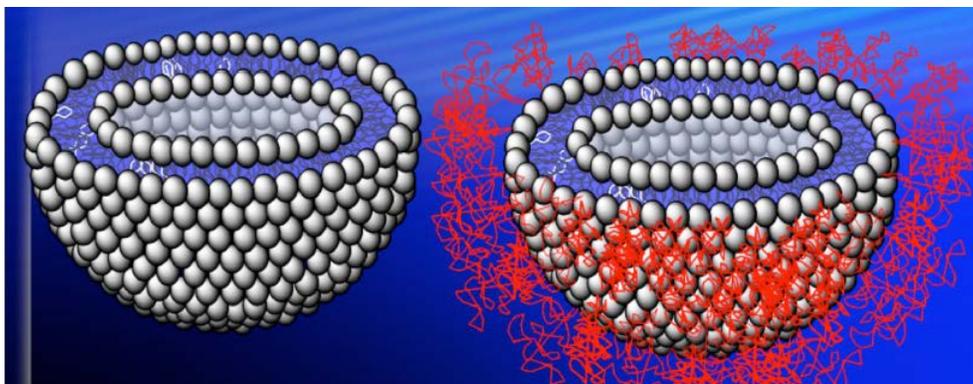


Fig. 8. Estructura básica de un liposoma, corresponde a un liposoma unilaminar debido a que solo contiene una bicapa lipídica. Del lado derecho observamos la conformación de un liposoma pegilado.¹⁶

2.5 Materiales magnéticos

Las nanopartículas magnéticas son partículas sintéticas de óxidos metálicos (Fe, Au, Cu, Al, Ag, etc.) con un tamaño de partícula entre 10-1000 nm.²⁸

Los materiales magnéticos son caracterizados por la presencia de dipolos magnéticos generados por el giro de sus electrones. Estos electrones polarizados pueden estar alineados de forma paralela o antiparalela con respecto a sus vecinos en la red cristalina, dando lugar a una interacción que causa el efecto magnético macroscópico que podemos medir. Dependiendo de la respuesta magnética observada, podemos clasificar a los materiales como paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnetos y antiferrimagnetos. Tal comportamiento depende mucho del tamaño de la partícula y la temperatura a la que se encuentre, lo que significa que al cambiar estos parámetros también se alterará el comportamiento magnético del material.²⁹

Los materiales magnéticos presentan 3 propiedades magnéticas, estas son: ferromagnetismo, diamagnetismo y paramagnetismo.

En cuanto a los materiales empleados, destaca el hierro tanto en su estado puro como oxidado que son de los más investigados para fines biomédicos, son muy importantes sus derivados como la magnetita (Fe_3O_4) y la magnemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) porque pueden usarse para estudios *in vivo* ya que no causan estrés oxidativo como los compuestos con cobalto y níquel.

Actualmente estos nanomateriales se están implementando como acarreadores en la quimioterapia ayudando a reducir los efectos adversos ya que concentran al fármaco en el tejido tumoral, esto se debe principalmente a que estos compuestos al aplicarles un campo magnético, transforman la energía magnética en térmica, con esto incrementan la sensibilidad hacia la quimio o radioterapia, activa la respuesta inmune y llega a destruir el tejido del tumor.³⁰

2.6 Farmacocinética

2.6.1 Generalidades sobre la farmacocinética

La farmacocinética describe de forma cuantitativa el paso de los fármacos a través del cuerpo. Emplea diferentes parámetros como la biodisponibilidad, volumen de distribución y depuración (clearance), para describir la velocidad y la magnitud de absorción del fármaco a la circulación sistémica, el paso del fármaco de la circulación a los tejidos y su eliminación del cuerpo. Con ayuda de estos estudios es posible determinar los regímenes de dosificación de un fármaco debido a que pueden predecirse las concentraciones de este en la sangre, esperando a que alcance la necesaria para que tenga su efecto terapéutico.³¹

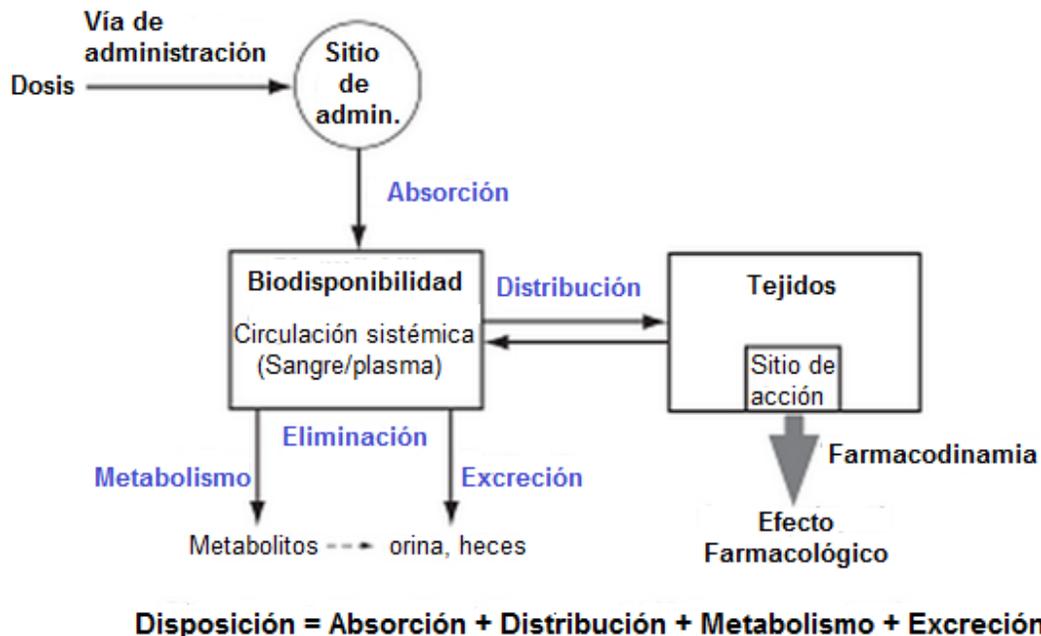


Fig. 9. Esquema que representa de forma simple el proceso farmacocinético. ³²

2.6.2 Modelo ADME

Los fármacos pasan por tres procesos en nuestro cuerpo, los cuales son: la absorción, distribución y eliminación (este último abarca metabolismo y excreción).

2.6.2.1 Absorción

Se entiende como absorción al proceso mediante el cual los fármacos pasan del sitio de aplicación a la circulación sistémica.

El proceso de absorción se ve excluido cuando estos se administran de forma intravenosa o en las aplicaciones tópicas donde el fármaco entra en contacto de forma directa con su sitio de acción.

2.6.2.2 Distribución

El siguiente proceso por el que pasan los fármacos es por la distribución. Esta consiste en el intercambio del fármaco entre la sangre y los tejidos del cuerpo, el paso de un fármaco de un tejido a otro solo puede darse mediante la sangre. Los principales órganos por los que pasan son por el hígado, riñones y músculos.

2.6.2.3 Eliminación

Es el último proceso por el que pasan los fármacos, en el cual estos son removidos del cuerpo por cualquier mecanismo. Los principales son:

Excreción: Es cuando el fármaco intacto (sin ninguna alteración en su estructura química) es removido del cuerpo. Un claro ejemplo es la gentamicina que este puede encontrarse de forma intacta en la orina de un paciente al que se le es administrado.

Metabolismo: En este proceso el fármaco sufre alteraciones químicas, se espera que al ser alterados estos puedan ser eliminados por la orina o la bilis.

2.6.3 Parámetros farmacocinéticos

2.6.3.1 Volumen de distribución (Vd)

El volumen de distribución (Vd) es un parámetro que describe el comportamiento de un fármaco, este refleja la tendencia de este para distribuirse en la sangre o dentro de los tejidos. Se calcula con la siguiente fórmula $Vd = \text{dosis}/\text{concentración}$. Como este valor se relaciona de manera directa con la masa corporal, se hace un

ajuste dividiendo entre el peso con el fin de estandarizarlo. Un valor grande de este implica una tendencia de distribuirse mayoritariamente en los tejidos debido a que una baja concentración del fármaco permanece en sangre, por otro lado un valor pequeño significa que este permanece por más tiempo en la circulación sistémica.

2.6.3.2 Tiempo de vida media ($t_{1/2}$)

Es una forma de expresar la velocidad con la que el fármaco es eliminado del organismo, consiste en el tiempo que se requiere para reducir a la mitad la concentración sanguínea del fármaco. Este puede variar entre pacientes porque depende de la función renal y hepática (eliminación).

2.6.3.3 Depuración (D)

Es otro parámetro que permite describir la eliminación del fármaco, la definición es el volumen de sangre que ha sido limpiado del fármaco por unidad del tiempo, por tal motivo sus unidades son ml/min o L/h. El fundamento se basa en que el fármaco una vez que es absorbido pasa a la circulación sistémica, al tiempo que se distribuye en los tejidos este también pasa al hígado o al riñón para sufrir el proceso de eliminación, por tal motivo podemos hablar de depuración renal y depuración hepática.

2.6.3.4 Área bajo la curva (ABC)

El área bajo la curva o ABC por sus siglas en inglés, es otro parámetro farmacocinético. Cuando se grafica la concentración sanguínea en función del

tiempo, se puede observar el gradiente en el que la concentración del fármaco se reduce formando una curva exponencial. El ABC es tal y como indica su nombre, el área bajo la curva de la concentración en función del tiempo, teniendo las unidades de $\text{masa} \cdot \text{tiempo} \cdot \text{volumen}^{-1}$, se encuentra estrechamente relacionado con la dosis y la biodisponibilidad, definida como la cantidad de fármaco que pasa sin cambios químicos a la circulación sistémica, por tal motivo se asume que para formulaciones administradas de forma i.v. es del 100 %, es decir, que todo el fármaco pasa sin cambios químicos a la circulación sistémica mientras que para otras vías de administración esta puede llegar a variar.

2.7 Antecedentes de formulaciones desarrolladas en el INCaN

El laboratorio de física médica en colaboración con el laboratorio de farmacología del Instituto Nacional de Cancerología desarrollaron una formulación de cisplatino liposomal (Alfonso Toro Córdoba, 2010), la cual mostró una farmacocinética diferente al cisplatino convencional (no-encapsulado), Fig. 10, observando un aumento de las concentraciones plasmáticas de cisplatino de hasta setenta veces con la formulación liposomal en comparación con el cisplatino convencional (no-encapsulado, el estudio se realizó hasta las 48 horas.

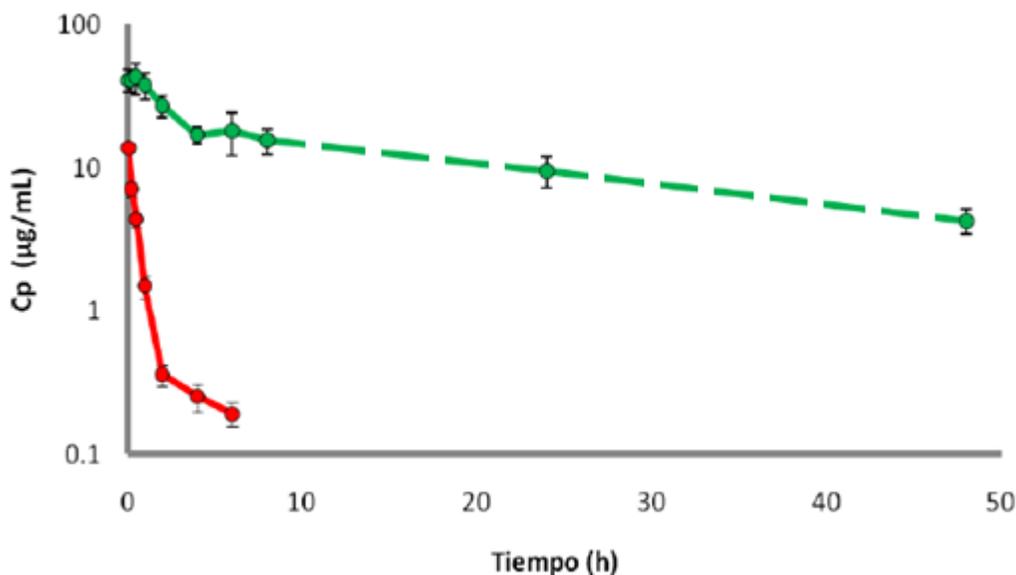


Fig 10. Curvas de concentración plasmática de cisplatino vs tiempo obtenidas tras la administración i.v. de 6 mg/kg de cisplatino convencional (—) y cisplatino liposomal (—). Cada punto representa el promedio \pm EE de seis ratas.

A partir de estos resultados, recientemente se desarrolló una formulación que co-encapsula cisplatino y nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4 , magnetita), teniendo una caracterización fisicoquímica aceptable, la cual mostró un tamaño de partícula promedio de 129.4 nm, una concentración de cisplatino encapsulado de 774.2 $\mu\text{g/mL}$, una concentración de hierro de 296.4 $\mu\text{g/mL}$ y un potencial z de -45.56 Mv.

Sin embargo, a la fecha se desconoce si la farmacocinética de la formulación que co-encapsula cisplatino y magnetita se modifica con respecto a la del cisplatino liposomal. Por lo que en el presente proyecto se planteó evaluar la farmacocinética de la nueva formulación liposomal y compararla con la del cisplatino liposomal.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

El cisplatino, cloruro de níquel, cloruro de sodio, ferrozine, sulfato de hierro amoniacal, heparina y dietilditiocarbamato sódico fueron obtenidos de Sigma-Aldrich®. El isoflurano utilizado como anestésico se obtuvo de Baker®.

Los solventes acetonitrilo y metanol de grado HPLC fueron obtenidos de J.T. Baker® y Fermont® respectivamente. El cloroformo utilizado fue de grado reactivo y se obtuvo de HYCEL de México S.A. El agua de alta calidad empleada para la cromatografía y la preparación de soluciones se obtuvo a partir de un sistema Milli-Q Reagent Water (Millipore®).

3.2. Animales

Para el estudio se emplearon ratas Wistar macho de un peso 300 g, proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Medicina UNAM plantel CU.

El protocolo para el manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

3.3. Formulación liposomal

En el laboratorio se cuenta con una formulación liposomal que co-encapsula cisplatino y nanopartículas de magnetita y otra que solo encapsula cisplatino, ambas desarrolladas y caracterizadas fisicoquímicamente en el laboratorio de física-médica del Instituto Nacional de Cancerología.

3.4 Farmacocinética de Cisplatino liposomal

Este estudio se realizó con un modelo preclínico en el cual se utilizaron 11 ratas Wistar, divididas en dos grupos, al primer grupo se le administró la nueva formulación liposomal que co-encapsula al cisplatino y la magnetita; mientras que al otro grupo se le administró la formulación liposomal que únicamente encapsula cisplatino.

Antes de comenzar el estudio farmacocinético, a las ratas se les retira el alimento 12 horas antes y se les deja el agua *ad libitum*. El día del experimento las ratas son anestesiadas con isoflurano empleando el equipo de anestesia VAPOMATIC™. Posteriormente se les lleva a cabo una cirugía donde se les realiza una incisión en la base de la cola para disecar la arteria caudal, después de esto se le realiza una canulación de la arteria utilizando un tubo de poliestireno PE10 Y PE50 (Stoelting Co.), posteriormente se sutura la piel y con ayuda de una jeringa se toman las muestras sanguíneas a los tiempos establecidos. Para la

administración I.V. se realiza una incisión en la vena yugular para introducir una cánula de poliestireno.

Se administró una dosis equivalente de 6 mg/kg de cisplatino por vía I.V. de la formulación liposomal de cisplatino-magnetita al primer grupo y el segundo grupo recibió la misma dosis de 6 mg/kg de cisplatino liposomal, después los animales fueron inmovilizados en cilindros de acrílico y se procedió a tomar las muestras sanguíneas de aproximadamente 300 μ L a los diferentes tiempos (0, 5, 15 y 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 y 96 horas).

Las muestras de sangre se colectan en microtubos de 1.5mL (COSTAR®) heparinizados y se centrifugan a 3,000 rpm por 10 min a 4°C para separar el plasma. Los plasmas obtenidos se almacenan a -20°C hasta su análisis.

Al final del experimento (96 horas) las ratas fueron sacrificadas y los órganos fueron extraídos (hígado, riñón y bazo) para llevar a cabo la cuantificación de cisplatino en cada tejido

3.4.1 Determinación de cisplatino en muestras plasmáticas

Se realiza por cromatografía de líquidos de alta resolución, siguiendo una metodología validada previamente en el laboratorio, la cual se muestra a continuación. (A. López-Flores, 2006, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods).

3.4.1.1 Preparación de la curva patrón

Para la cuantificación del cisplatino, se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de cisplatino en solución salina isotónica (0, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) en 100 μL utilizando como estándar interno cloruro de níquel (NiCl_2).

3.4.1.2 Preparación de las muestras

Las muestras de plasma y de la curva se extraen con 400 μL de acetonitrilo y se centrifugan a 10,000 rpm. El sobrenadante se lleva a sequedad bajo corriente de N_2 . Se utiliza como estándar interno al cloruro de níquel (NiCl_2). Se adicionan 10 μL de una solución en NaOH 0.1 M al 10 % del derivatizante dietilditiocarbamato sódico (DDTC) para que el cisplatino pueda formar un complejo que absorbe en el rango UV-visible, la mezcla se incuba a 37°C en un termomezclador (Eppendorf®) para que se lleve a cabo la reacción. Posteriormente el cisplatino se extrae con 100 μL de cloroformo y se centrifugan a 10,000rpm por 10min a 4°C . Finalmente, la fase clorofórmica se inyectan en el equipo cromatográfico.³⁴

3.4.1.3. Condiciones cromatográficas

El equipo cromatográfico consiste de una bomba Modelo 2695 (Waters™) con detector de luz UV 2487 (Waters™). Se utiliza una columna de fase reversa Symmetry® C18 (3.9x150mm) de $5\mu\text{m}$ de tamaño de partícula (Waters™). La

fase móvil utilizada es Agua-Metanol-Acetonitrilo (28:40:32) a un flujo de 1.8mL/min. La detección se realiza a 254nm y el volumen de inyección es de 20µL.

3.4.2 Análisis farmacocinético

Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados usando el software WINONLIN Professional V.2. Los datos se ajustaron a un modelo de dos compartimentos. Se determinaron los siguientes parámetros: área bajo la curva (ABC), Concentración máxima al tiempo cero (C_p^0), depuración total (D), volumen de distribución (Vd) y las vidas medias de distribución y eliminación ($t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$).

3.5 Cuantificación de cisplatino en órganos

Para la cuantificación de cisplatino intratejido, aproximadamente 500 mg de cada tejido se homogeneizaron con 500 µL de un buffer de lisis, posteriormente el tratamiento que se le dio fue similar al que recibieron las muestras plasmáticas y la cuantificación se realizó por HPLC siguiendo las condiciones mencionadas anteriormente.

3.6 Cuantificación de hierro en plasma

La cuantificación del hierro se llevó a cabo por una técnica espectrofotométrica UV-Visible por la formación de un complejo colorido entre el ferrozine y el hierro en un estado de oxidación de 2+.

El procedimiento experimental se inicia con la preparación de la curva patrón con sulfato ferroso amoniacal hexahidratado de alto grado de pureza a distintas concentraciones (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg de hierro/mL). Se construye una gráfica de absorbancia en función de la concentración de cada punto de la curva, para poder obtener las concentraciones de las muestras.

La curva al igual que las muestras se tratan con 10 μ L de ácido clorhídrico y se centrifugan para ionizar el hierro y precipitar proteínas y fosfolípidos que puedan interferir en la cuantificación, se adicionan 970 μ L de un buffer de acetatos a un pH de 4.9 para que se pueda efectuar la reacción, esta solución además contiene ácido ascórbico al 33.3 % m/v que reduce el hierro a un estado de oxidación de 2+ para que pueda formar un complejo colorido con el ferrozine, este complejo absorbe a los 570 nm.

3.7 Análisis estadístico

Se realizó una prueba de t de Student para determinar las posibles diferencias en los parámetros farmacocinéticos de cisplatino y para la cuantificación del fármaco en tejidos entre los dos grupos de animales de experimentación, empleando el software GraphPadPrism 5.

4. RESULTADOS

4.1 Farmacocinética del cisplatino encapsulado en ambas formulaciones liposomales

En la figura 11 se muestran las curvas de concentración plasmática de cisplatino en función del tiempo de ambas formulaciones liposomales. Se puede observar que las concentraciones plasmáticas de cisplatino de la formulación de cisplatino-magnetita muestra un ligero aumento en comparación con la formulación de cisplatino liposomal, el cuál no fue estadísticamente significativo.

El modelo al que se ajustó el sistema fue a uno de dos compartimentos debido a que se observan dos pendientes, una que indica una fase de distribución en las primeras 8 horas y otra que indica una fase de eliminación en los demás tiempos.

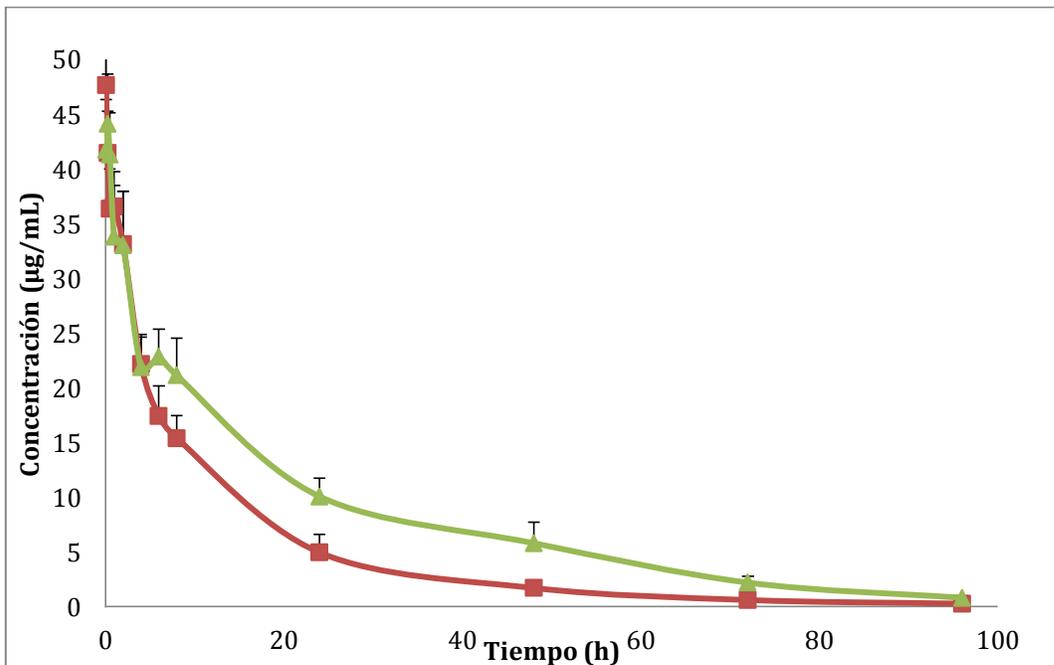


Fig 11. Curvas de concentración plasmática de cisplatino vs tiempo después de la administración i.v. de 6mg/kg de cisplatino liposomal (■), cisplatino y nanopartículas de magnetita liposomal (▲). Cada punto representa el promedio \pm EE de 5-6 animales.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de las dos formulaciones. Los datos corresponden al promedio de 5-6 animales \pm EE.

Tratamiento	cis-magnetita (n=6)	Cis liposomal (n=5)
ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}\cdot\text{Kg}$)	819.56 \pm 140.59	519.27 \pm 71.07
C_{MAX} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	45.20 \pm 4.47	56.21 \pm 6.38
T $\frac{1}{2}$ Beta (h)	22.44 \pm 1.99	22.13 \pm 7.14
D (mL/h)	8.32 \pm 1.26	12.54 \pm 1.90
Vd (mL/Kg)	139.52 \pm 13.95	112.71 \pm 13.24

4.2 Farmacocinética de magnetita

En la figura 12 se muestran las concentraciones plasmáticas de hierro en función del tiempo después de una administración I.V. de la formulación liposomal de cisplatino y nanopartículas de magnetita. Se observa un incremento de las concentraciones circulantes de hierro en comparación con las concentraciones basales encontradas (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

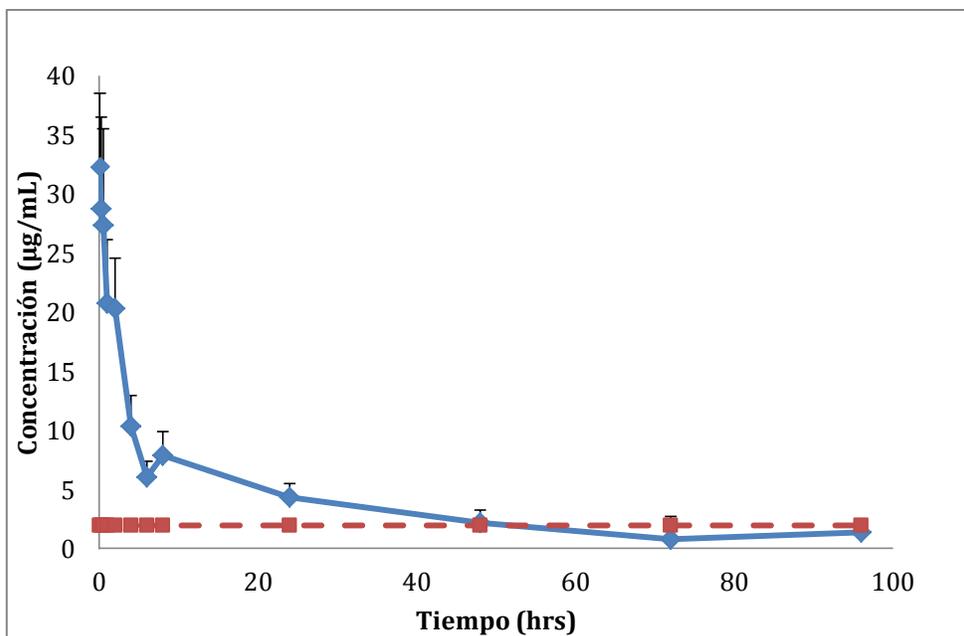


Fig. 12. Curvas de concentración plasmática de hierro vs tiempo obtenidas tras la administración i.v. de una dosis de 2 mg/kg de nanopartículas de hierro (◆), mientras que la línea punteada (—) representa el promedio de las concentraciones basales de hierro en plasma. Cada punto representa el promedio de 6 animales \pm EE.

En la tabla 3 se muestran los parámetros farmacocinéticos del hierro encontrados después de la administración de la nueva formulación liposomal.

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos del hierro.

Parámetro	Resultado
ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}\cdot\text{Kg}$)	352.84 ± 81.81
Cp^0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	37.17 ± 7.88
$T_{1/2}$ Beta (h)	46.48 ± 16.93
D (mL/h)	7.75 ± 1.89
Vd (mL/Kg)	63.07 ± 18.06

4.3 Cuantificación de cisplatino en tejidos

Para la determinación de cisplatino en tejido hepático, renal y esplénico, se cuantificó la cantidad de cisplatino que se acumulaba en cada uno de estos órganos. En la figura 13 se muestran los resultados. Observamos que no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa de la acumulación de cisplatino, tanto en hígado como en riñón, entre el cisplatino liposomal y la formulación que co-encapsula cisplatino y nanopartículas de magnetita.

En el caso del bazo observamos un incremento de cisplatino, después de la administración de la formulación liposomal de cisplatino y nanopartículas de magnetita en comparación con el cisplatino liposomal. Sin embargo debido a la variabilidad, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

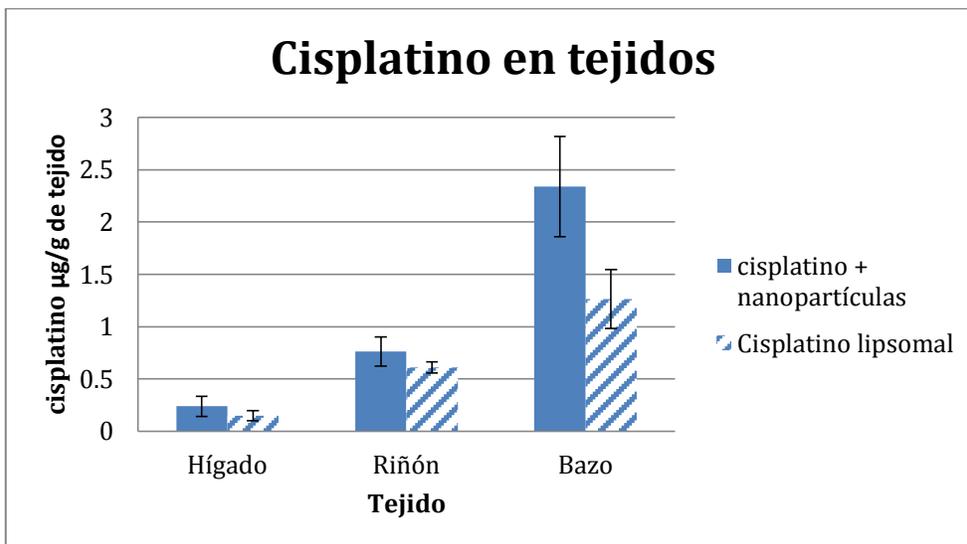


Fig. 13. Concentración de cisplatino en tejido hepático, renal y esplénico, cada color representa a una formulación mientras que cada barra representa el promedio \pm EE de todos los animales del estudio

4.4 Toxicidad sistémica

La toxicidad sistémica se evaluó con la pérdida del porcentaje de peso corporal. En la figura 14 observamos que hubo una ligera pérdida del porcentaje del peso corporal del 10 % en ambas formulaciones liposomales. Sin embargo, no hubo diferencia significativa de pérdida de peso entre las dos formulaciones.

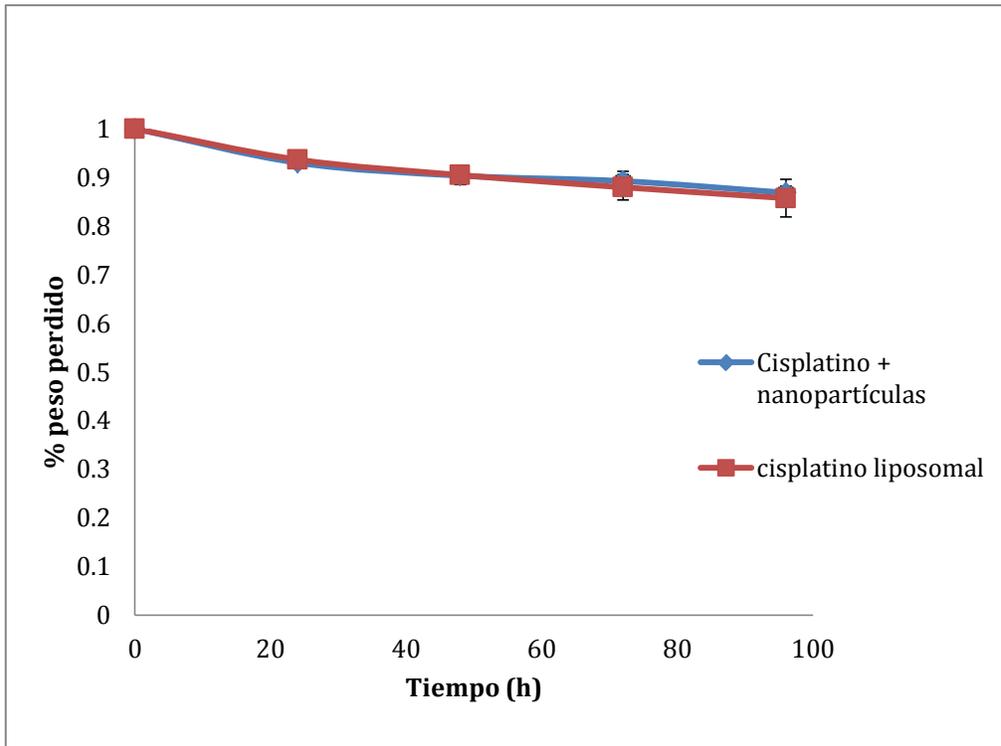


Figura 14. Porcentaje de peso corporal en función del tiempo. Cada punto se representa el promedio del porcentaje de peso corporal \pm EE. En azul se observa el peso de las ratas tratadas con cisplatino y nanopartículas de magnetita mientras que de rojo observamos a las ratas del cisplatino liposomal

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los liposomas representan un sistema de liberación de fármacos que podrían favorecer la acumulación del fármaco en el sitio blanco en el que se requiere su acción terapéutica. Los liposomas han demostrado tener varias ventajas sobre los fármacos convencionales (no-encapsulados), incluyendo a los quimioterapéuticos; entre estas ventajas se tiene un incremento de la solubilidad de los fármacos lipofílicos, mayor estabilidad, un tiempo más prolongado de circulación del fármaco y el potencial para aumentar su índice terapéutico.

Una vez que el fármaco es encapsulado, su farmacocinética depende de las propiedades fisicoquímicas del acarreador, por tal motivo la farmacocinética del fármaco liposomal varía en comparación con el fármaco convencional e incluso se tiene una variabilidad de esta entre las diferentes formulaciones liposomales.

Los factores que pueden influir en la farmacocinética de los sistemas liposomales, van desde la variabilidad intrapaciente hasta las propiedades fisicoquímicas del liposoma como el tamaño de partícula, carga, composición lipídica, ligandos conjugados; además de que una de los factores más importantes para la variabilidad es el sistema fagocítico mononuclear (MPS) por sus siglas en inglés, ya que participan en la eliminación de los liposomas.³⁵

Como se mencionó anteriormente, en el laboratorio en el que se realizó el presente trabajo, se tienen antecedentes de que el cisplatino encapsulado en un

sistema liposomal muestra diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos en comparación con el convencional, siendo uno de los más importantes el ABC, el cual presentó un aumento de 70 veces en el sistema liposomal con respecto al no encapsulado.³³

Por tal motivo en el presente trabajo se evaluó la farmacocinética de dos formulaciones liposomales, una de cisplatino liposomal y otra que co-encapsula cisplatino y nanopartículas de magnetita.

La co-encapsulación de fármacos tiene varias ventajas con respecto a la encapsulación de un solo componente. Se puede obtener un efecto sinérgico, es decir, que potencian su acción terapéutica. En el caso de fármacos convencionales es necesario que estén en una proporción específica para lograr un efecto sinérgico; sin embargo, como cada fármaco tiene una farmacocinética distinta, es complicado establecer un régimen de dosificación para que llegue la cantidad y proporción requerida de cada fármaco al sitio de acción, por tal motivo esta clase de liposomas evitan estas complicaciones y logran que lleguen los fármacos en las proporciones requeridas para mostrar ya sea su sinergismo, efecto protector, etc.; en el sitio tumoral.^{36, 37}

Las curvas de concentración plasmática del fármaco en función del tiempo, nos permiten ver el comportamiento de fármaco en el organismo, es decir, la concentración máxima alcanzada, la biodisponibilidad, la eliminación, etc., estos datos nos permiten saber si la dosis administrada es suficiente, establecer

regímenes de dosificación para que las concentraciones se mantengan dentro de la ventana terapéutica. También es posible comparar si dos formulaciones modifican sus parámetros farmacocinéticos, como el caso de comparar el fármaco convencional (no encapsulados) con uno liposomal.

En el presente trabajo se comparó la farmacocinética de dos formulaciones liposomales de cisplatino. Las curvas de concentración plasmática de cisplatino en función del tiempo, obtenidas después de la administración de los tratamientos se muestran en la Figura 11. Podemos observar que hay un ligero aumento en la concentración plasmática de cisplatino de la formulación liposomal con nanopartículas de magnetita en comparación con la formulación de cisplatino liposomal.

La explicación a este ligero aumento podría deberse a que la presencia de magnetita probablemente pueda conferirle cierta estabilidad al sistema liposomal; sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. Ambas formulaciones presentan una liberación sostenida del fármaco con concentraciones observables hasta las 96 horas. Con esto se comprueba que la inclusión de las nanopartículas de magnetita al sistema liposomal no influye sobre la concentración de cisplatino en plasma.

Los parámetros farmacocinéticos como ABC, D, $t_{1/2}$ y Vd; muestran que los datos se ajustaron a un modelo de dos compartimentos, en el cual se observa una fase de distribución y una de eliminación. En la tabla 2 se muestran los parámetros

farmacocinéticos obtenidos para ambas formulaciones, no observando diferencias estadísticamente significativas.³⁸

Se ha reportado que el Vd de la mayoría de los fármacos antineoplásicos está relacionado directamente con su toxicidad, así que entre mayor sea su Vd, mayor será su toxicidad. Se sabe que el Vd disminuye para los sistemas liposomales y con ello también se ha visto reducida su toxicidad. Esto se demostró en el laboratorio al comparar una formulación liposomal de cisplatino con una de cisplatino convencional³³. Sin embargo el Vd de ambas formulaciones de cisplatino, con o sin magnetita, es similar, no presentándose diferencias estadísticamente significativas. Como este parámetro es dependiente de la dosis y Cp^0 , era de esperarse ya que ambas formulaciones presentaron concentraciones muy similares.

El volumen de distribución no presentó cambios estadísticamente significativos entre ambas formulaciones ni en estudios previos (Toro, 2010), solo que se ve una reducción a la mitad en comparación con el Vd del cisplatino convencional, por lo que hay una mayor concentración sanguínea del cisplatino por tiempos más prolongados.

Con respecto a la eliminación del fármaco, los resultados con la D y el $t_{1/2}$ nos permiten proponer que la estructura del sistema liposomal de cisplatino y nanopartículas de magnetita se mantiene estable como la formulación liposomal que no contiene magnetita, conservando las características de los liposomas

pegilados (stealth) evitando el reconocimiento del sistema retículoendotelial evitando la remoción de los liposomas de la circulación sanguínea.

Por último se analizó el ABC, un parámetro estrechamente relacionado con la biodisponibilidad, varios agentes quimioterapéuticos reportan una pobre biodisponibilidad en su forma convencional y que se esperara aumentar con las formulaciones liposomales, ya que esta deficiente biodisponibilidad se asocia a la toxicidad sistémica y limitaciones para llegar al sitio de acción ³⁸. Este parámetro tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones liposomales de cisplatino evaluadas (tabla 2). Aunque se observa un ligero aumento en la formulación liposomal con magnetita.

El aumento de la biodisponibilidad nos permite sugerir que en la acumulación del cisplatino en el tumor será mayor debido a que los liposomas pueden aprovechar el efecto de permeabilidad y retención aumentada que presentan los tumores (EPR), debido a su excesiva vasculatura con fenestras y baja circulación linfática. Además se esperaría que los magnetoliposomas, después de pasar por un campo magnético alterno, puedan ejercer su efecto de aumentar la temperatura y con ello se logró liberar una mayor cantidad de fármaco para incrementar el efecto farmacológico y además que el aumento de la temperatura sensibilice a las células tumorales, siendo el objetivo de la quimiotermoterapia. Al final pese a que los cambios de formulación podría sugerir cambios en los parámetros farmacocinéticos, estos no fueron significativos ni con reportes previos (Toro Alfonso, 2010).

Una vez que el fármaco es administrado, su distribución e interacción que tenga en el organismo dependerá de sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas, debido a que por lo general no son sustancias endógenas del organismo, estas pueden tener una mala biodistribución desencadenándose en una mala selectividad de tejidos que producen una serie de reacciones adversas, sobre todo en fármacos empleados para el tratamiento de cáncer que tienen una severa citotoxicidad.³⁹

En el presente trabajo también se determinó la cantidad de cisplatino en tejido renal, hepático y esplénico con la finalidad de identificar la acumulación en los órganos que participan en la eliminación de los sistemas liposomales.

Podemos observar que la acumulación de cisplatino en tejido hepático y renal es similar en ambas formulaciones, las concentraciones concuerdan con las reportadas en la literatura.^{14, 40}

Sin embargo, en tejido esplénico la formulación liposomal de cisplatino-magnetita mostró un incremento en las concentraciones de cisplatino. Esto podría deberse a que los liposomas activan la respuesta inmune a pesar de estar pegilados, la elevación de la respuesta inmune puede ser ocasionada por la presencia de magnetita lo que podría explicar por qué hay una mayor acumulación de cisplatino en el tejido esplénico.

La toxicidad sistémica puede ser evaluada con la pérdida del peso corporal ya que una disminución de más del 20 % del peso corporal podría significar que hay un daño sistémico significativo. Nuestros resultados mostraron que el peso corporal de los animales de ambas formulaciones liposomales no disminuyó más allá del 20 % lo que nos indica que probablemente no se presente una toxicidad sistémica. Sin embargo, cabe mencionar que estos resultados deberán ser comprobados con los ensayos de eficacia.⁴¹

En los últimos años se han desarrollado diversas formulaciones liposomales de cisplatino, sin embargo la mayoría ha demostrado eficacia *in vitro* pero no resultados prometedores al aplicarse en clínica. Una de las excepciones ha sido el LipoplatinTM que ha demostrado una reducción de la toxicidad sistémica, de la respuesta inmune y ha contrarrestado varios mecanismos de resistencia.⁴²

Las nanopartículas superparamagnéticas se distribuyen en células reticuloendoteliales como las células de Kuppffer por su actividad fagocítica. La magnetita es una nanopartícula superparamagnética que aparentemente no causa toxicidad *in vivo* en ratas⁴³, por tal motivo son de los materiales con más aplicación en sistemas biológicos.

Actualmente varias formulaciones que incluyen nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro han sido aprobadas para su uso clínico, especialmente para la imagenología del hígado por resonancia magnética nuclear.

Teniendo en el mercado formulaciones como las recubiertas con dextran (Endorem® and Feridex®) y las recubiertas con carboxidextran (Resovist®).⁴⁴

En nuestra formulación se espera que la farmacocinética de la magnetita encapsulada se modifique en comparación con las nanopartículas superparamagnéticas libres o de otras formulaciones. En un reporte realizado por Hui Li Ma en el 2008 se muestran los parámetros farmacocinéticos de una formulación de nanopartículas superparamagnéticas conjugadas con alginatos. En este trabajo se administró una dosis de 6.11 mg/kg y se obtuvieron los siguientes parámetros una C_{max} de $147.01 \pm 20.72 \mu\text{g/mL}$, un ABC de $68.37 \pm 18.87 \text{ h } \mu\text{g/mL}$ y un $t_{1/2}$ de $0.25 \pm 0.06 \text{ h}$. De acuerdo a nuestros resultados; al administrarse una dosis de 2 mg/kg de la magnetita encapsulada en el sistema liposomal, observamos una diferencia significativa de los parámetros farmacocinéticos en comparación con los reportados por Hui Li Ma en el 2008, demostrando una mayor biodisponibilidad con nuestra formulación.

Con los resultados obtenidos, en la figura 12 podemos observar que las nanopartículas de magnetita, se ajustan a un modelo farmacocinético de 2 compartimentos, muy similar al del cisplatino, por lo que se demuestra que la magnetita permanece encapsulada.

El tiempo de vida media y el área bajo la curva de la magnetita muestran un incremento. Lo que se espera se vea reflejado en una mayor cantidad de

magnetita en el sitio tumoral, con lo que se puede aplicar el tratamiento de hipertermia utilizando este sistema, en modelos experimentales de cáncer.⁴⁵

Además se observó que a las 48 horas se ha eliminado la magnetita, lo que significa que tenemos concentraciones basales de este, es por ello que a partir de este tiempo se puede ver una concentración constante de hierro.

6. CONCLUSIONES

- Los parámetros farmacocinéticos de cisplatino de la formulación liposomal de cisplatino y nanopartículas de magnetita, no mostraron diferencias significativas en comparación con el cisplatino liposomal.
- Las concentraciones de cisplatino en tejido hepático y renal de ambas formulaciones liposomales son similares.
- Se observa un incremento en la captación de cisplatino en el tejido esplénico con la formulación liposomal que contiene magnetita.
- La farmacocinética de magnetita muestra un comportamiento de 2 compartimentos.
- Ambas formulaciones no presentaron una disminución en el peso corporal mayor al 20 %, lo que demuestra que no hay toxicidad sistémica.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de hipertermia magnética con la formulación desarrollada en el laboratorio.
- Realizar estudios in vivo de eficacia con la formulación liposomal aplicando quimioterapias.
- Evaluar la toxicidad del tratamiento en modelos preclínicos de cáncer.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Artículo “Cáncer” recuperado el 7 de octubre del 2013 en:
<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
2. Boticario C, Cascales-Angosto M. *Innovaciones en cáncer*. 1º edición editorial UNED, España 2008.
3. Artículo “Cáncer” recuperado el 7 de octubre del 2013 en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
4. Burke JB. (2004). Outcome Prediction and the Future of the TNM Staging System. *Journal of the National Cancer Institute*, Oct 6:96(19):1420-5
5. Seoane-González B. TMN. Escala de estadiaje del cáncer. Medicina Interna. CHU Juan Canalejo. A Coruña <http://www.meiga.info/escalas/TNM.pdf>
6. Artículo “tratamientos contra el cáncer en la actualidad” recuperado el 1 de septiembre del 2014 en: <https://www.criscancer.org/es/por-que-cris.php?zona=1&seccion=3&apartado=22>
7. Artículo “¿Cuáles son los diferentes tipos de tratamiento contra el cáncer?” recuperado el 2 de septiembre del 2014 en:
<http://www.cancer.org/espanol/servicios/comohablarsobrecancer/fragmentado/cua>

ndo-alguien-en-su-trabajo-tiene-cancer-questions-and-answers-about-cancer-treatment

8. Artículo “¿Qué es la radioterapia?”, recuperado el 2 de septiembre del 2014 en:
<http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectossecundarios/radioterapia/radioterapia-una-guia-para-los-pacientes-y-sus-familias-what-is-radiation-therapy>

9. Katzung BG, Masters BS, Trevor AJ. *Farmacología Básica y clínica*. 12ª edición, editorial McGraw-Hill. China 2012.

10. Artículo “Quimioterapia”, recuperado el 20 de noviembre del 2014 en:
<http://lema.rae.es/drae/srv/search?id=61hJaOe6ZDXX2JQOWrEY>

11. Artículo “Principios de la quimioterapia” recuperado el 8 de octubre del 2013 en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002996-pdf.pdf>

12. Artículo “Quimioterapia” recuperado el 8 de octubre del 2013 en:
<http://umm.edu/health/medical/spanishency/articles/quimioterapia>

13. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (2 de febrero)” 28 de enero del 2014, Datos nacionales INEGI.

14. Devarajan P, Tarabishi R, Mishra J, Ma Q, Kourvetaris A, Vougiouka M, Boulikas T. (2004). Low Renal Toxicity of Lipoplatin Compared to Cisplatin in Animals. *Anticancer research*, 24: 2193-2200.

15. Zhao G, Rodriguez L. (2013). Molecular targeting of liposomal nanoparticles to tumor microenvironment. *International Journal of Nanomedicine*, 8 61–71

16. Boulikas T. (2007). Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, Lipoplatin™. Lipoplatin™ as a chemotherapy and antiangiogenesis drug. *Cancer Therapy*, Vol 5, 349-376.

17. Kunjachan S, Blauz A, Möckel D, Theek B, Kiessling F, Etrych T, Ulbrich K, Blois LV, Storm G, Bartosz G, Rychlik BZ, Lammers T. (2012). Overcoming cellular multidrug resistance using classical nanomedicine formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45 421–428.

18. Haley B, Frenkel E. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol*, 26(1):57–64.

19. Penate Medina O, Haikola M, Tahtinen M, et al. (2011). Liposomal tumor targeting in drug delivery utilizing MMP-2- and MMP-9-binding ligands. *J Drug Deliv*. 2011:160515.

20. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep.* 64(5):1020-37
21. Vemuri S, Rhodes CT. (1991). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 70:95-111.
22. Lasic DD. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16:307-21.
23. Yokoe J, Sakuragi S, Yamamoto K, Teragaki T, Ogawara K, Higaki K, Katayama N, Kai T, Sato M, Kimura T. (2008). Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1-2):28-34.
24. Uhumwangho MU and Okor RS. (2005). Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *Journal of Medicine and Biomedical Research*, 4(1):9-21.
25. Ilchrist RD, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. (1957). Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann Surg*, 4:596–606. doi: 10.1097/00000658-195710000-00007.

26. Richly H, Grubert M, Scheulen ME and Hilger RA. (2009). Plasma and cellular pharmacokinetics of doxorubicin after intravenous infusion of Caelyx™/Doxil® in patients with hematological tumors*. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 47 – No. 1/2009 (55-57).
27. Paliwal SR, Paliwal R, Agrawawal GP, Vyas SP. (2011). Liposomal nanomedicine for breast cancer therapy. *Nanomedicine* 6:1085-1100.
28. Neuberger T, Schöpf B, et al. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1): 483-496.
29. 2000 WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Fed. Rep. of Germany.
30. Marszałł MP. (2011). Application of Magnetic Nanoparticles in Pharmaceutical Sciences. *Pharm Res* 28:480–483 DOI 10.1007/s11095-010-0284-6
31. Philip R. *Pharmacokinetics*. 1ª edición Ventus Publishing APS 2012
32. Hacker M, Bachman K, Messer W. *Pharmacology principles and practice*. Academic Press 2009. USA

33. Toro-Córdoba A. (2010). *Elaboración y caracterización farmacocinética de una formulación liposomal de cisplatino*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

34. Lopez-Flores A, Jurado R, Garcia-Lopez P. (2005). A high-performance liquid chromatographic assay for determination of cisplatin in plasma, cancer cell, and tumor samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 52 366 – 372.

35. Schell RF, Sidoneb BJ, Carona WP, Walsh MD, Zamboni BA, Ramanathan RK, Zamboni WC. (2014). Meta-analysis of inter-patient pharmacokinetic variability of liposomal and non-liposomal anticancer agents. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, xx xxx–xxx

36. Wong MY, Chiu GNC. (2011). Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7 834–840

37. Shaikh IM, Tan KB, Chaudhury A, Liu Y, Tan BJ, Tan BMJ, Chiu GNC. (2013). Liposome co-encapsulation of synergistic combination of irinotecan and doxorubicin for the treatment of intraperitoneally grown ovarian tumor xenograft. *Journal of Controlled Release*, 172 852–861

38. Dou YN, Zheng J, Foltz WD, Weersink R, Chaudary N, Jaffray DA, Allen C. (2014). Heat-activated thermosensitive liposomal cisplatin (HTLC) results in effective growth delay of cervical carcinoma in mice. *Journal of Controlled Release*, 178 69–78.
39. Yamashita F, Hashida M. (2013). Pharmacokinetic considerations for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 139–147
40. Wang S, MI JB, LI Y, Chang WB, CI YX, Zhao MZ, Zhao YK, Zhu LY, XU G. (2003). Pharmacokinetics and tissue distribution of iv injection of polyphase liposome-encapsulated cisplatin (KM-1) in rats. *Acta Pharmacol Sin Jun*; 24 (6): 589-592.
41. The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Weight loss in research animals. Approved January 16, 2003, Revised February 27, 2004, September 9, 2011, updated 4/2014.
42. Casagrandea N, De Paoli M, Celegato M, Borghese C, Mongiat M, Colombatti A, Aldinucci D. (2013). Preclinical evaluation of a new liposomal formulation of cisplatin, lipoplatin, to treat cisplatin-resistant cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, Volume 131, Issue 3, December 2013, Pages 744–752
43. Ali T, Mohamed M, Mohamady T, El kader M. (2011). In vivo toxicological evaluation of magnetite nanoparticles. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*

- PHOTODIAGNOSIS PHOTODYN THER 01/2011; 8(2):206-206. DOI:

10.1016/j.pdpdt.2011.03.277

44. Ma HL, Xu YF, Qi XR, Maitani Y, Nagai T. (2008). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 354 217–226.

45. Iversen NK, Frische S, Thomsen K, Laustsen C, Pedersen M, Hansen PBL, Bie P, Fresnais J, Berret JF, Bastrup E, Wang T. (2013). Superparamagnetic iron oxide polyacrylic acid coated γ -Fe₂O₃ nanoparticles do not affect kidney function but cause acute effect on the cardiovascular function in healthy mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 266 276–288.